

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年9月2日 (02.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/074478 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/10 (74) 代理人: 高島一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
大阪府大阪市中央区伏見町四丁目2番14号 藤村
大和生命ビル Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/001419 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2004年2月10日 (10.02.2004) (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-041790 2003年2月19日 (19.02.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤沢
薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418514 大阪府大阪市中央区道
修町三丁目4番7号 Osaka (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 笹川由香
(SASAKAWA, Yuka) [JP/JP]; 〒5418514 大阪府大阪市
中央区道修町三丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会
社内 Osaka (JP). 直江吉則 (NAOE, Yoshinori) [JP/JP];
〒5418514 大阪府大阪市中央区道修町三丁目4番
7号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF ESTIMATING ANTITUMOR EFFECT OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR

(54) 発明の名称: ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の予測方法

WO 2004/074478 A1
(57) Abstract: In order to provide a gene useful in estimating drug effects (in particular, an antitumor effect) of a histone deacetylase inhibitor on tumor to be treated, it is intended to provide a method of obtaining a gene which is likely usable as an indication in estimating the drug effects of the histone deacetylase inhibitor, at least comprising: (1) the step of classifying tumor cells into histone deacetylase inhibitor-sensitive tumor cells and resistant tumor cells; and (2) the step of examining the gene expression manner in each of the sensitive tumor cells and the resistant tumor cells and selecting (i) a gene which is highly expressed in the sensitive tumor cells but less expressed in the resistant tumor cells, or (ii) a gene which is highly expressed in the resistant tumor cells but less expressed in the sensitive tumor cells.

(57) 要約: 治療を所望する腫瘍に対するヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効、特に抗腫瘍効果を予測するのに
有用な遺伝子を提供するため、少なくとも、①腫瘍細胞を、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤感受性腫瘍細胞と抵抗
性腫瘍細胞とに分類する工程、および②感受性腫瘍細胞ならびに抵抗性腫瘍細胞のそれぞれにおいて、その遺伝子
発現様式を調べて、(i) 感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、あるいは(ii) 感
受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子を選択する工程を含むヒストンデアセチラーゼ阻
害剤の薬効予測の指標となり得る遺伝子を得る方法を提供する。

明細書

ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の予測方法

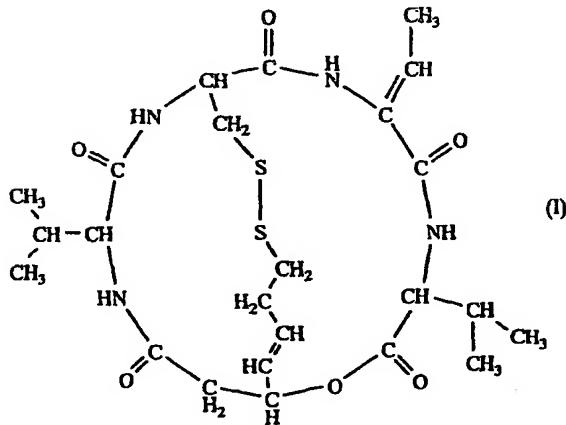
技術分野

本発明は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効、具体的には抗腫瘍効果を予測するのに有用な遺伝子を得る方法、ならびに当該遺伝子の発現様式を調べることを含む該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効（抗腫瘍効果）を予測する方法に関する。

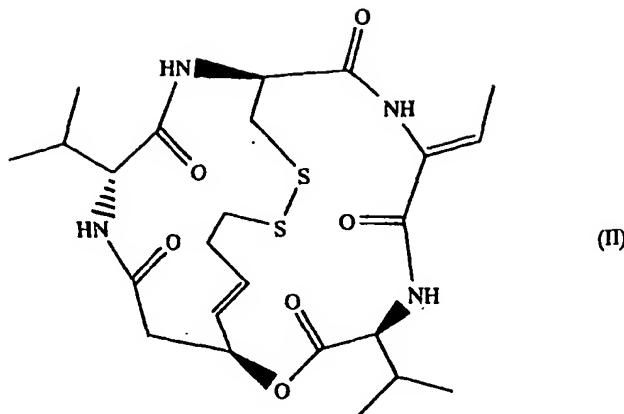
背景技術

近年、患者の個人差を考慮した「オーダーメイド医療」が重要視され、薬剤が効く癌、効かない癌を識別するためのマーカー探索が必要とされている。これは、薬剤が効くという可能性をあらかじめ検証してから患者に投薬することによって、薬剤の奏効率をあげるとともに毒性を回避し、無意味な薬剤使用を抑制することで倫理的・医療的に薬剤治療のコストパフォーマンスを上昇させる試みである。また、癌治療においては、基礎研究と臨床の間の溝を埋める重要な手段となりうるため、抗癌剤の薬効を予測する方法の開発が望まれていた。

例えば、式（I）



で表される化合物（以下、化合物Aとも称する；配列表配列番号1）、特に式（I）



で表される立体異性体(FK 228)が、ヒストンデアセチラーゼ阻害作用を有し、強力な抗腫瘍活性を誘導することが報告されている(例えば特公平7-64872号公報、「エクスペリメンタル セル リサーチ(Experimental Cell Research)」, 5 (米国), 1998年, 第241号, p. 126-133参照)。しかしながら、該化合物の抗腫瘍効果を予測できる因子を立証した報告はなく、インビトロでの結果がそのままインビボでも適用できるのか否か、どの腫瘍に対してもインビボで有用な効果を示すのか否か、等解決すべき点が多く残されているのが現状である。

10

発明の開示

本発明の目的は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、特に強力なヒストンデアセチラーゼ阻害作用を有することが知られている化合物Aの薬効を予測するのに有用な、薬効予測の指標となり得る遺伝子を得る方法ならびに、該遺伝子の発現様式を調べることを特徴とする当該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効を予測する方法を提供することにある。

本発明者らは、上記問題を解決するために銳意研究を行った結果、腫瘍の種類によって、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果が変動すること、さらに当該変動がある特定の遺伝子や蛋白質の発現様式の変化に連動して観察されることを見出し、これらの特定の遺伝子(タンパク質)を同定し、また腫瘍における、20 これらの遺伝子の発現様式を観察し、かかる観察をもとにヒストンデアセチラ

ゼ阻害剤の薬効を予測または評価する方法を見出して本発明を完成するに至った。すなわち本発明は以下の通りである。

(1) ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効予測の指標となり得る遺伝子を得る方法であって、少なくとも、

5 ①腫瘍細胞に対して、インビボにおけるヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を調べ、当該腫瘍細胞について、該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤に対して感受性を有する細胞種（感受性腫瘍細胞）と抵抗性を有する細胞種（抵抗性腫瘍細胞）とに分類する工程、および

②上記工程①で分類された感受性腫瘍細胞ならびに抵抗性腫瘍細胞のそれぞれに

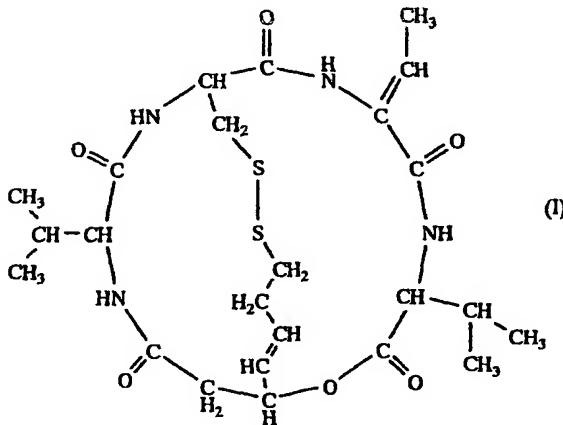
10 おいて、その遺伝子発現様式を調べて、さらに

(i) 感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、あるいは

(ii) 感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子を選択する工程

15 を含む方法。

(2) ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が、以下の化学式 (I) :



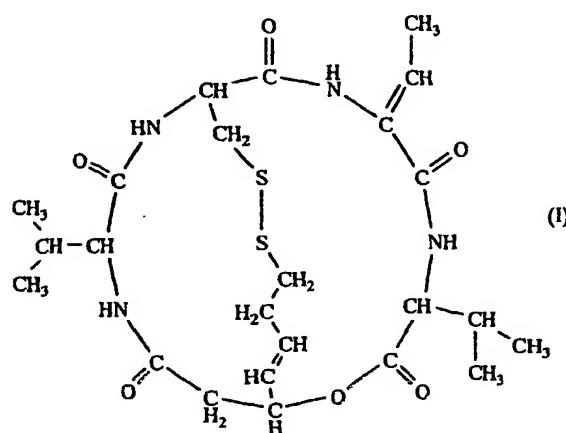
で表される化合物であるかまたはその医薬上許容し得る塩である、(1)に記載の方法。

20 (3) 腫瘍細胞が前立腺癌、胃癌、または腎臓癌由来のものである、(1)または

(2) に記載の方法。

(4) (1) の方法で得られた少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を、少なくとも 1 種の腫瘍細胞において調べることを特徴とする、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を予測する方法。

5 (5) ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が、以下の化学式 (I) :



で表される化合物であるかまたはその医薬上許容し得る塩である、(4) に記載の方法。

10 (6) 少なくとも 1 つの遺伝子が、感受性細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子である、(4) または (5) に記載の方法。

(7) 少なくとも 1 つの遺伝子が、感受性細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子である、(4) または (5) に記載の方法。

(8) (1) に記載の方法で得られた少なくとも 1 つの感受性細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、および少なくとも 1 つの感受性細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子の発現量を、少なくとも 1 種の腫瘍細胞において調べることを特徴とする、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を予測する方法。

(9) 腫瘍細胞が前立腺癌、胃癌、または腎臓癌由来のものである、(4) ~ (8) のいずれかに記載の方法。

図1は、FK228のヒト前立腺癌((a); PC-3)および腎臓癌((b); ACHN)に対する抗腫瘍効果を示すグラフである。縦軸は腫瘍増殖率を、横軸は初回投与後の経過日数を示している。腫瘍増殖率は、Day 0における腫瘍体積を1としたときの、それ以後の腫瘍体積の相対的割合で表した。

5

発明の詳細な説明

本発明は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効、特に抗腫瘍効果を予測する指標となる遺伝子を得る方法を提供する。かかる方法により得られる遺伝子の腫瘍細胞における発現様式を解析することにより、該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤がその治療に有用であるか否か、あるいは対象とする癌が該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤に有効であるか否か等の情報を得ることができ、「オーダーメイド医療」に貢献することが可能となる。また、標的とする腫瘍細胞において抗腫瘍効果を発揮することができるヒストンデアセチラーゼ阻害剤を、実際に人体に投与することなく見出すことが可能となる。

「ヒストンデアセチラーゼ阻害剤」とは、ヒストンデアセチラーゼの活性部位に基質と競合して結合する化合物、またはヒストンデアセチラーゼの活性部位とは別の部位に結合してヒストンデアセチラーゼの酵素活性を変える作用を有する化合物を意図し、既にヒストンデアセチラーゼ阻害剤として、その用途が公知の化合物を含め、ヒストンデアセチラーゼ阻害活性を有することが報告されている全ての化合物（合成、天然を問わない）ならびに今後報告されるであろう全ての化合物を含む。具体的には、上述の化合物Aまたはその塩やその誘導体（例えば、化合物Aをアセチル化したものやS-S結合を還元したチオール体等）が挙げられる。さらにトリコスタチンA、酪酸ナトリウム、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)、MS-275、Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide、Apicidin、Trapoxin等もヒストンデアセチラーゼ阻害活性が報告されている化合物である。

化合物Aは、不斉炭素原子および二重結合に基づく光学異性体または幾何異性体等の立体異性体を有することがあるが（例えばFK228）、これらすべての異

性体及びそれらの混合物もこの発明において用いられるヒストンデアセチラーゼ阻害剤の範囲に含まれる。

さらに、化合物 A、FK 2 2 8 またはそれらの塩の溶媒和化合物（例えば包接化合物（例えば水和物等））もこの発明の範囲に含まれる。

5 本明細書中、特に断りのない限り、単に化合物 A という場合には式（I I）で表される化合物（FK 2 2 8）も含む、立体異性を問わない化合物群を意味する。

化合物 A またはその塩は、公知の物質であり、入手可能である。例えば、化合物 A の立体異性体の一つである FK 2 2 8 は、それを生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株を好気性条件下に培養、当該培養プロセスから当該物質を回収することによって得ることができる。FK 2 2 8 を生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株としては、例えばクロモバクテリウム・ビオラセウム WB 9 6 8 (F E R M B P - 1 9 6 8) が挙げられる。FK 2 2 8 はより具体的には特公平 7 - 6 4 8 7 2 号（対応米国特許 4 9 7 7 1 3 8 号）公報に記載のとおりにして当該生産菌から得ることができる。FK 2 2 8 は、より容易に入手できるという点で、
15 FK 2 2 8 を生産しうるクロモバクテリウム属に属する菌株からの回収が好ましいが、さらなる精製工程が不要あるいは少なくてすむという点で、合成あるいは半合成の FK 2 2 8 もまた有利である。同様に FK 2 2 8 以外の化合物 A についても、従来公知の方法により半合成、全合成することができる。より具体的には Khan W. Li, らによって報告されている方法 (J. Am. Chem. Soc., vol. 118, 7237-7238 (1996))
20 に準じて製造することができる。

化合物 A の塩としては、無機塩基との塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩）、有機塩基との塩（例えばトリエチルアミン塩、ジイソプロピルエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、エタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N' -ジベンジルエチレンジアミン塩等の有機アミン塩）、無機酸付加塩（例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等）、有機カルボン酸・スルホン酸付加塩（例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフ

ルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等)、塩基性あるいは酸性アミノ酸(例えばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等)との塩等の、塩基との塩または酸付加塩が挙げられる。

5 本発明において、インビボ、インビトロとは通常、当分野で用いられている用語どおりであり、すなわち、「インビボ」とは、対象とする生体の機能や反応が体内で発現される状態を意味し、「インビトロ」とは当該機能や反応が試験管内(組織培養系、細胞培養系、無細胞系等)で発現されることを意味する。

本発明のヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を予測する指標となり得
10 10 遺伝子を得る方法は、少なくとも以下の工程を含む。

①腫瘍細胞に対して、インビボにおけるヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を調べ、当該腫瘍細胞について、該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤に対して感受性を有する細胞種(感受性腫瘍細胞)と抵抗性を有する細胞種(抵抗性腫瘍細胞)とに分類する工程、および

15 ②上記工程①で分類された感受性腫瘍細胞ならびに抵抗性腫瘍細胞のそれぞれにおいて、その遺伝子発現様式を調べて、さらに

(i) 感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、あるいは

(ii) 感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子

20 を選択する工程。

本発明において使用する試験対象となる腫瘍細胞(以下、単に試験細胞とも称する)としては、ヒストンデアセチラーゼを有する細胞であれば特に限定されないが、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果、特に該阻害剤の腫瘍部位特異性を評価することも本発明の課題の一つであることから、使用する試験細胞は、

25 その効果を調べたい腫瘍由来の細胞であることが好ましい。例えば、前立腺癌への効果を評価する場合には、ヒト前立腺培養癌細胞であるP C - 3 細胞等が用いられ、腎臓癌への効果を評価する場合には、ヒト培養腎臓癌細胞であるA C H N

細胞等が用いられる。これらの癌細胞を含め試験細胞として使用する各種培養ヒト癌細胞は、市販されているかあるいは、種々の細胞バンク等から入手可能である。また、長期的な治療効果、あるいは個々の患者に対する有効性、すなわちオーダーメイド医療を鑑みる上で、患者の腫瘍から得られる癌細胞を培養し、当該癌

5 細胞を試験細胞として用いることも可能である。

腫瘍細胞に対して、インビボにおけるヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を調べる工程は、例えば以下のような手順で行う。

まず、試験対象となる腫瘍細胞をマウス、ラット、ウサギ、ハムスター、モルモット等の試験動物に移植して実験的に腫瘍を形成させる系を作製する。かかる
10 系において、腫瘍移植後にヒストンデアセチラーゼ阻害剤を投与し腫瘍の増殖率を測定することによってヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を評価する。増殖率の測定は簡便には形成される腫瘍のサイズを測定することにより行う。

試験動物への腫瘍細胞の移植は当分野で通常行われているようにして実施することができる。例えばヌードマウスで継代増殖させた固形腫瘍の一部をマウスに
15 移植する方法が挙げられる。また、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の投与も通常、その抗腫瘍効果を期待して投与されるのと同様な量が、同様な方法で投与され得る。即ち、腹腔内、静脈内、筋肉内または経口投与による適用が挙げられ、また、投与量は投与すべき試験動物の種類、体重、移植した癌の種類によっても異なるが、通常マウスに静脈内投与する場合であれば、 $1 \text{ mg} / \text{kg} \sim 5 \text{ mg} / \text{kg}$ 程
20 度を投与する。

また、試験動物への投与を目的として、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤を溶液にする場合の溶媒はヒストンデアセチラーゼ阻害剤を溶解することが可能で、且つ、試験対象となる腫瘍細胞あるいは試験動物に対し毒性を示さない限り特に制限はなく、通常、エタノール、PEG 400、10% HCO-60 溶液、ジメチ
25 ルスルホキシド等、およびそれらの混合溶媒等で濃縮液を調製してから、生理食塩水等の生理的緩衝液で所望の濃度に希釀して使用する。

所定のヒストンデアセチラーゼ阻害剤をある任意の投与量投与した場合に、増

殖抑制率が 70 %以上（好ましくは 80 %以上）の強い増殖抑制効果が認められた腫瘍細胞を、そのヒストンデアセチラーゼ阻害剤に対する「感受性腫瘍細胞」に、増殖抑制率が 30 %以下（好ましくは 20 %以下）の弱い増殖抑制効果が認められた腫瘍細胞を、そのヒストンデアセチラーゼ阻害剤に対する「抵抗性腫瘍細胞」に、それぞれ分類する。

例えばヒストンデアセチラーゼ阻害剤が化合物 A の場合、化合物 A 感受性腫瘍細胞と化合物 A 抵抗性感受性細胞とに分類する。

化合物 A 感受性腫瘍細胞とは、化合物 A によって前述の基準による腫瘍細胞の強い増殖抑制効果が認められるタイプの腫瘍細胞をいい、例えば、後述する実施例からも示されるように前立腺癌細胞 PC - 3 が挙げられる。また、他に胃癌の細胞である SC - 6 も化合物 A 感受性腫瘍細胞の 1 種である。一方化合物 A 抵抗性腫瘍細胞とは、前述の基準による化合物 A による腫瘍細胞の弱い増殖抑制効果しか認められないタイプの腫瘍細胞をいい、例えば、後述する実施例からも示されるように腎臓癌細胞 ACHN が挙げられる。また、他に腎臓癌細胞である A 438 も化合物 A 抵抗性腫瘍細胞の 1 種である。

分類された感受性腫瘍細胞ならびに抵抗性腫瘍細胞のそれぞれにおいて、その遺伝子発現様式を調べて、さらに (i) 感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、あるいは (ii) 感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子（以下、当該遺伝子を総称して、抗腫瘍効果予測遺伝子とも称する）を選択する工程は、本明細書中に記載される各技術ならびに当分野で通常実施される方法を用いて行うことができる。好ましくは、一度に大量の遺伝子の発現様式が解析できるという利点から遺伝子チップを用いた技術を用いる。

腫瘍細胞における抗腫瘍効果予測遺伝子の発現様式を解析することは、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤を患者に投与することなくインビトロの試験によって該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効を予測する有力な手段となり得る。

本発明は、抗腫瘍効果予測遺伝子の発現量を少なくとも 1 種、好ましくは 2 種

以上の腫瘍細胞において調べることを特徴とするヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を予測する方法を提供する。

遺伝子の発現様式を解析する方法もまた、当分野で通常実施される方法を用いて行うことができる。例えば以下のような手順が挙げられる。

5 (1) 試験対象となる腫瘍細胞から遺伝子、特にmRNA、または蛋白質を抽出する。

かかる工程は、通常当分野で用いられる方法によって行うことができ、また、必要な試薬等を含めたキットも利用することができる。腫瘍細胞からの遺伝子あるいは蛋白質の抽出は、適当にコンフルエントになった腫瘍細胞から抽出しても10 よいが、より多量に抽出できるので、マウス等の動物で継代し、さらに移植・増大させた腫瘍片から抽出することが好ましい。

(2) 特定の遺伝子（または特定の蛋白質）に特異的に親和性を有する物質を用いて、該特定の遺伝子（または特定の蛋白質）の存在を検出する。ここで、特定の遺伝子（または特定の蛋白質）としては、上記したヒストンデアセチラーゼ阻15 害剤の薬効予測の指標となり得る遺伝子あるいは、該遺伝子がコードする蛋白質であり、具体的には後述する表1～3に挙げられる遺伝子である。

本発明において測定する特定の遺伝子（または特定の蛋白質）は、1種類の測定でも充分に有用であるが、より詳細な抗腫瘍効果を知る必要がある場合には、2種以上の特定の遺伝子（または特定の蛋白質）を同時に測定することが好ましい。より好ましくは、感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い20 遺伝子の群、あるいは感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子の群の、それぞれの群から少なくとも1種ずつの発現を解析することが好ましい。

特定の遺伝子または特定の蛋白質に特異的に親和性を有する物質としては、それらの試験細胞中での発現が検出できる程度の感度を有するものであれば特に制限されない。ここで、「特異的親和性」とは目的の遺伝子または蛋白質にのみハイブリダイズまたは結合する性質を意味する。特定の遺伝子を検出するための当該

物質としては、当該遺伝子の全部もしくは一部に完全相補的なものか、もしくは上記性質を満たす範囲で1乃至数個のミスマッチを含んでいるものが挙げられる。具体的には当該遺伝子の塩基配列の全部もしくは一部、ならびにそれらの相補配列を含むオリゴまたはポリヌクレオチド等が挙げられ、検出すべき遺伝子の形態

5 に応じて適宜選択する。かかる物質は当該遺伝子との特異的親和性を有している限りはその由来は特に限定されず、合成されたものであっても、当該遺伝子から必要な部分を切り出し、通常行なわれる方法によって精製されたものであってもよい。これらはまた蛍光物質、酵素やラジオアイソトープ等で標識されていてもよい。特定の蛋白質を検出するための当該物質としては、例えば当該蛋白質に特

10 異的親和性を有する抗体またはその断片が挙げられ、その特異的親和性とは抗原・抗体反応により該蛋白質を特異的に認識し、結合する能力のことである。該抗体またはその断片は、当該蛋白質と特異的に結合可能なものであれば特に限定されず、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体およびそれらの機能的断片のいずれであってもよい。これらの抗体あるいはその機能的断片は、通常当分野で行な

15 われている方法によってつくられる。これらの抗体またはその断片は、蛍光物質、酵素やラジオアイソトープ等で標識されていてもよい。

試験細胞からの遺伝子、特にmRNAの抽出、ならびに蛋白質の抽出は、当分野で通常実施されている方法を用いて、また適宜組み合わせて実施することができる。mRNAを抽出した場合には、上記した特定の遺伝子に特異的親和性を有

20 する物質を用いてノザンプロット、RT-PCR法等の当分野で通常行なわれる手法を用いてその発現様式を調べる。一方、蛋白質を抽出した場合には、上記した特定の蛋白質に特異的親和性を有する物質（抗体またはその断片等）を用いてイムノプロット、ウエスタンプロット等の当分野で通常行なわれる手法を用いてその発現様式を調べる。

25 また、当該遺伝子の発現様式の解析は、上述の方法に加え、好ましくは、一度に大量の遺伝子の発現様式が解析できるという利点から遺伝子チップを用いた技術を用いる。

抗腫瘍効果予測遺伝子の発現様式を解析することにより、試験したヒストンデアセチラーゼ阻害剤が試験した腫瘍細胞に効果的に抗腫瘍活性を示すか否かを予測することができる。例えば感受性腫瘍細胞の方が抵抗性腫瘍細胞に比べて発現が2倍以上高い遺伝子群（抗腫瘍効果予測遺伝子A）ならびに抵抗性腫瘍細胞の方が感受性腫瘍細胞に比べて発現が2倍以上高い遺伝子群（抗腫瘍効果予測遺伝子B）に分類した場合、抗腫瘍効果予測遺伝子Aの発現が高い腫瘍細胞、および／または抗腫瘍効果予測遺伝子Bの発現が低い腫瘍細胞に対しては、当該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果が期待できる。

また、遺伝子チップを用いる場合には、以下のような操作を行って薬効を予測することができる。

1. 化合物A投与前の癌患者から腫瘍組織の一部を採取する。
2. 腫瘍組織よりRNAを抽出する。
3. 抽出したRNAより、cDNAの合成、cRNAの合成、cRNAの断片化を行なう。
4. 遺伝子チップでハイブリダイゼーションを行なう。
5. 遺伝子チップを洗浄、染色し、スキャンする。
6. 感受性腫瘍の薬効予測候補遺伝子群の発現パターン^{*)}との相同性を検討する
(^{*)} 解析画面において、発現量が高い遺伝子(normalized dataが1以上)は赤、発現量が低い遺伝子(normalized dataが1未満)は青で表示される)。
7. 相同性が高い腫瘍ほど薬効発現の可能性が高いと判断する。

臨床的に腫瘍細胞を患者から採取したものを試験細胞として用いた場合には、個々の患者による個体特異性をも反映した抗腫瘍効果の予測が可能となる。

本発明では、上述したようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の評価方法を利用して、腫瘍の部位（種類）特異的な抗腫瘍活性を有するヒストンデアセチラーゼ阻害剤のスクリーニング方法を提供することができる。対象となる腫瘍由来の試験細胞を用い、また、その効果を調べようとするヒストンデアセチラーゼ阻害剤で処理し、上述の方法に従ってその抗腫瘍効果の有無を調べること

により、個々の阻害剤の腫瘍の部位特異性を判断することができる。

実施例

以下、本発明を実施例にて具体的且つ詳細に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

5 実施例 1

化合物 A 感受性腫瘍および化合物 A 抵抗性腫瘍の評価

(1) 薬剤調製

FK 228 を必要量計り、溶媒 (10%HCO-60/saline) を加え、超音波をかけ溶解する。陽性対照物質パクリタキセルは、試験に先立って 24 mg / mL となるよう Cremophor EL/ethanol (1:1) 液に溶解し、冷蔵保存した。用時、9 倍量の生理食塩水を加えて希釀し 2.4 mg / mL (溶媒成分 : 5%Cremophor EL-5%ethanol-90%saline) とした。

(2) 実験動物

薬剤の抗腫瘍試験には、日本チャールスリバーより BALB/cANnNCrj-nu/nu マウス (雄、6 週齢) を購入し、一週間以上の馴化飼育の後、実験に用いた。マウスは SPF 環境下飼育し、水と餌を自由に摂取させた。

(3) 実験腫瘍

ヒト培養腎臓癌細胞株 1 系 (ACHN : ATCC より入手)、ヒト培養前立腺癌細胞株 1 系 (PC-3 : ATCC より入手) を $2 \sim 3 \times 10^7$ 個ヌードマウス皮下に移植し、増殖した固形腫瘍を 3 代以上継代後、実験に用いた。

(4) 実験移植および群分け

ヌードマウスで継代した固形腫瘍を、約 3 mm 角の腫瘍組織片としてマウスの右背部皮下に移植した。腫瘍移植後、腫瘍体積 ($1/2 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$) が $100 \sim 300 \text{ mm}^3$ に達した時点で、1 群を 6 匹に、腫瘍のばらつきが無くなるよう 25 うに群分けした。

(5) 投与

投与は群分け当日 (Day 0) に開始した。FK 228 投与群には 4 日毎に 3 回

(q 4 d × 3)、FK 228 を静脈内投与した (3. 2 および 1. 8 mg / kg)。陽性対照物質パクリタキセル投与群には 5 日間連続 (q d × 5) でパクリタキセルを静脈内投与した (24 mg / kg)。対照群には、溶媒 (10% HCO-60 / saline) のみを投与した (q 4 d × 3)。各投与液量は 0.1 mL / 10 g 体重を投与日に測定した体重をもとに算出した。なお、FK 228 の 3. 2 mg / kg / day (q 4 d × 3) およびパクリタキセルの 24 mg / kg / day (q d × 5) はそれぞれのMTD量である。

(6) 腫瘍サイズおよび体重の測定

腫瘍サイズ (長径、短径) および体重を Day 0 より週 2 回測定した。

10 (7) 抗腫瘍効果の評価

腫瘍の増殖程度は腫瘍増殖率 (Relative Tumor Volume) により評価した。増殖抑制率は、Day 0 における腫瘍体積を 1 としたときの、それ以後の腫瘍体積の相対的割合で表した。

結果を図 1 に示す。FK 228 は 3. 2 mg / kg の投与量で PC-3 に強い抗腫瘍作用を示した (図 1 (a)) が、ACHN (図 1 (b)) に対して抗腫瘍作用を示さなかった。

実施例 2

化合物 A 感受性腫瘍および化合物 A 抵抗性腫瘍の評価

〈材料・手順〉

20 (1) 実験材料

薬剤 化合物 A (FK 228)

投与量 : 3. 2 mg / kg

投与容量 : 10 mL / kg

溶媒 : 10% HCO-60/saline 液

25 剤形 : 溶液 (用時調製)

腫瘍細胞 ヒト前立腺癌 PC-3 (腫瘍片 3 mm × 3 mm × 3 mm / マウス 移植部位 s. c.)

ヒト胃癌SC-6；財団法人実験動物中央研究所より入手(腫瘍片 3 mm×3 mm×3 mm/マウス 移植部位 s. c.)

ヒト腎臓癌ACHN(腫瘍片 3 mm×3 mm×3 mm/マウス 移植部位 s. c.)

5 ヒト腎臓癌A498；ATCCより入手(腫瘍片 3 mm×3 mm×3 mm/マウス 移植部位 s. c.)

継代動物 雄性 BALB c/ nu/nu

(2) 手順と結果

実施例1に示した方法によりヌードマウスの皮下に3 mm角の腫瘍片(ヒト前立腺癌PC-3、ヒト胃癌SC-6、ヒト腎臓癌ACHNおよびヒト腎臓癌A498)を移植し、腫瘍体積がおよそ100～300 mm³(長径9 mm、短径8 mm)になった時点でFK228 3.2 mg/kgを静脈内に投与した場合の腫瘍増殖抑制率はそれぞれ98%、84%、20%および29%であった。この結果から、PC-3およびSC-6を化合物A感受性腫瘍、ACHNおよびA498を化合物A抵抗性腫瘍とした。

実施例3

遺伝子チップによる化合物A感受性腫瘍ならびに化合物A抵抗性腫瘍における遺伝子発現様式の解析

実施例2でその感受性あるいは抵抗性が確認された腫瘍における遺伝子発現様式を調べた。

(1) 実験材料

腫瘍細胞 ヒト前立腺癌PC-3(腫瘍片 3 mm×3 mm×3 mm/マウス 移植部位 s. c.)

ヒト胃癌SC-6；財団法人実験動物中央研究所より入手(腫瘍片 3 mm×3 mm×3 mm/マウス 移植部位 s. c.)

ヒト腎臓癌ACHN(腫瘍片 3 mm×3 mm×3 mm/マウス 移植部位 s. c.)

ヒト腎臓癌A498; ATCCより入手（腫瘍片 3mm×3mm×3mm/マウス 移植部位 s.c.）

継代動物 雄性 BALB c/ nu/nu

RNA抽出 RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen)

5 RNase, DNase free water (Life Technologies)

DNA合成 Superscript Choice System (Life Technologies)

エタチンメイト (ニッポンジーン)

T7-(dT)24 Primer (Amersham Pharmacia)

cRNA合成 BioArray RNA Transcript Labeling Kit (Amersham Pharmacia)

10 cRNA断片化 Trizma Base (SIGMA)

氷酢酸 (SIGMA)

酢酸マグネシウム (SIGMA)

酢酸カリウム (SIGMA)

ハイブリダイゼーション Eukaryotic Hybridization Control Kit (Amersham

15 Pharmacia)

0.5M EDTA solution (SIGMA)

MES Sodium Salt (SIGMA)

MES Free Acid Monohydrate (SIGMA)

Herring Sperm DNA (Promega)

20 Acetylated Bovine Serum Albumin Soln. (Life

Technologies)

使用 chip HuGene FL アレイ (Amersham Pharmacia)

(2) 細胞調製とRNA抽出

ヌードマウスの皮下に3mm角の腫瘍片（ヒト前立腺癌PC-3、ヒト胃癌S

25 C-6、ヒト腎臓癌ACHNおよびヒト腎臓癌A498）を移植し、腫瘍体積が
およそ100～300mm³（長径9mm、短径8mm）になった時点で腫瘍を
摘出し、RNeasy Mini Kit (50) (Qiagen)のプロトコルに従って全RNAを抽出し

た。RNAを定量し、電気泳動で確認した。

(3) c RNAの合成

GeneChipマニュアルの第2章～第4章、RNeasy Mini Kit および RNA Transcript Labeling Kit のマニュアルに従い、RNAの精製、cDNAの合成、cRNAの
5 合成、cRNAの断片化を行った。

(4) ハイブリダイゼーション、洗浄－染色、スキャンニング

ハイブリダイゼーション、洗浄－染色、スキャンニングは GeneChipマニュアル
の第5章～第7章に従って行った。

(5) 解析

10 GeneSpring (マイクロアレイデータ解析ソフト : Silicon Genetics 社製) を用
いて解析を行った。

解析条件は以下の通りである。

解析条件

・Raw data が少なくとも 4 つの腫瘍細胞のうち 1 つの腫瘍で 100 以上である。

15 ① 化合物 A 感受性腫瘍間、または化合物 A 抵抗性腫瘍間の normalized data の差
が 2 倍以内である。

② 化合物 A 感受性腫瘍と化合物 A 抵抗性腫瘍の normalized data の差が 2 倍以上
である。

結果、化合物 A 感受性腫瘍の方が化合物 A 抵抗性腫瘍より 2 倍以上発現が高い

20 遺伝子を 27 個 (表 1)、化合物 A 抵抗性腫瘍の方が化合物 A 感受性腫瘍より 2 倍
以上発現が高い遺伝子を 49 個 (表 2～3) 得た。

表1：化合物A感受性腫瘍 (Sensitive Tumor) で発現が高く化合物A抵抗性腫瘍 (Resistant Tumor) で発現が低い遺伝子

	Gene Accession No.	Description
1	L11005_at	aldehyde oxidase 1
2	X12517_at	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C
3	U43944_at	malic enzyme 1, soluble
4	U52100_at	epithelial membrane protein 2
5	U65579_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8 (23kD) (NADH-coenzyme Q reductase)
6	X06272_at	signal recognition particle receptor ('docking protein')
7	D42047_at	The ha3662 gene product is related to mouse glycerophosphate dehydrogenase.
8	D90086_at	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
9	U61734_s_at	
10	J03798_at	small nuclear riboprotein Sm-D
11	X05299_at	centromere protein B (80kD)
12	L34155_at	laminin, alpha 3 (nicaerin (150kD), kalinin (165kD), BM600 (150kD), epilegrin)
13	U60521_at	caspase 9, apoptosis-related cysteine protease
14	Y10807_s_at	HMT1 (hnRNP methyltransferase, <i>S. cerevisiae</i>)-like 2
15	U44754_at	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kD
16	U78107_at	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, gamma
17	U60644_at	similar to <i>Vaccinia</i> virus HindIII K4L ORF, and to <i>Vaccinia</i> virus p37 (HindIII F13L ORF)
18	U32986_s_at	damage-specific DNA binding protein 1 (127kD)
19	D59253_at	RNA-binding protein that has two RNP consensus motifs
20	U41767_s_at	a disintegrin and metalloproteinase domain 15 (metargidin)
21	U10550_at	Source: Human Gem GTPase (gem) mRNA, complete cds.
22	D38521_at	The ha0919 gene product is novel.
23	J04823_rnal_at	cytochrome c oxidase subunit VIII
24	M21154_at	S-adenosylmethionine decarboxylase 1
25	X78565_at	hexabrachion (tenascin C, cytотactин)
26	D50405_at	histone deacetylase 1
27	X04366_at	calpain, large polypeptide L1

表2～3：化合物A感受性腫瘍 (Sensitive Tumor) で発現が低く化合物A抵抗性腫瘍 (Resistant Tumor) で発現が高い遺伝子

表2：

	Gene Accession No.	Description
1	U84487_at	small inducible cytokine subfamily D (Cys-X3-Cys), member 1 (fractalkine, neurotactin)
2	M33600_f_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 5
3	J03474_at	amyloid A precursor
4	L24564_at	Ras-related associated with diabetes
5	J05428_at	UDP glycosyltransferase 2 family, polypeptide B7
6	L03840_s_at	fibroblast growth factor receptor 4
7	M35878_at	insulin-like growth factor binding protein 3
8	HG4318-HT4588_s_at	
9	X87241_at	FAT tumor suppressor (Drosophila) homolog
10	M59807_at	natural killer cell transcript 4
11	HG2379-HT3996_s_at	
12	D16532_at	very low density lipoprotein receptor
13	U37546_s_at	apoptosis inhibitor 1
14	X72889_at	Source: <i>H. sapiens</i> hbrm mRNA.
15	U66838_at	cyclin A1
16	Z23090_at	heat shock 27kD protein 1
17	U16031_at	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced
18	D84110_at	alternative splicing (see also D84107-D84111)
19	M55998_s_at	
20	D28124_at	neuroblastoma candidate region, suppression of tumorigenicity 1
21	HG3548-HT3749_at	
22	X86809_at	phosphoprotein enriched in astrocytes 15
23	M79462_at	promyelocytic leukemia
24	M59465_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)
25	HG2379-HT3997_s_at	
26	Z36715_at	ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2) NOTE: Symbol and name provisional.
27	U41654_at	putative GTP-binding protein, homolog of small GTPase family members
28	U72882_s_at	Source: Human interferon-induced leucine zipper protein (IFP35) mRNA, partial cds.

表3：

29	U72649_at	rat PC3 and murine TIS21 genes homolog
30	U47621_at	
31	L22214_at	adenosine A1 receptor
32	U68494_at	Source: Human hbc647 mRNA sequence.
33	X69699_at	paired box gene 8
34	X63717_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6
35	U04285_s_at	
36	L38969_at	Source: Homo sapiens thrombospondin 3 (THBS3) mRNA, complete cds.
37	Y10032_at	Source: H. sapiens mRNA for putative serine/threonine protein kinase.
38	L48513_at	paraoxonase 2
39	U89942_at	lysyl oxidase-like 2
40	Z12173_at	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)
41	U59423_at	Sma and Mad homolog
42	X68277_at	dual specificity phosphatase 1
43	U45878_s_at	HIAP-1
44	L08187_at	
45	X71874_cds1_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10
46	D50863_at	testis-specific kinase 1
47	X91911_s_at	
48	U65011_at	encodes tumor antigen recognized by cytolytic T lymphocytes
49	U90313_at	glutathione-S-transferase like

産業上の利用可能性

5 本発明の方法によって得られるヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効、特に抗腫瘍効果の指標となり得る遺伝子は、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効との相関性、ならびに該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤への感受性あるいは抵抗性との相関性が示唆される遺伝子であり、これらの遺伝子がヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効予測マーカーとして利用できる可能性が示された。

10

配列表フリーテキスト

配列番号1：X a a は式 $\text{NH}_2\text{C}(\text{CHCH}_3)\text{COOH}$ で表されるアミノ酸である。

式 $\text{COOHCH}_2\text{CH}(\text{CHCHC}_2\text{H}_4\text{SH})\text{OH}$ のカルボキシル基が1番目のアミノ酸であるV_a1のアミノ基と結合し、水酸基が4番目のアミノ酸であるV_a1のカルボキシル基と結合し、SH基が2番目のアミノ酸であるC_ysのSH基とジスルフィド結合している。

5

本出願は、日本で出願された特願2003-041790を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

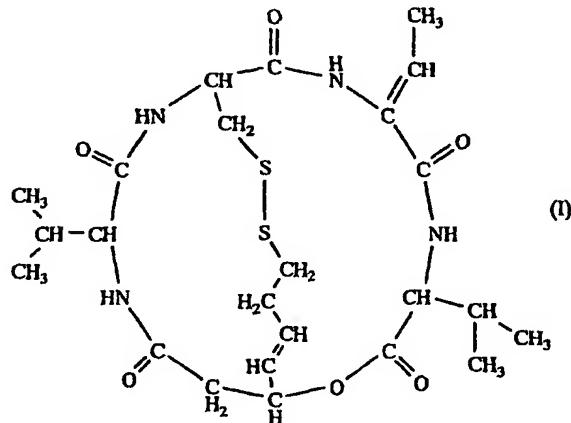
1. ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の薬効予測の指標となり得る遺伝子を得る方法であって、少なくとも、

5 ①腫瘍細胞に対して、インビボにおけるヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を調べ、当該腫瘍細胞について、該ヒストンデアセチラーゼ阻害剤に対して感受性を有する細胞種（感受性腫瘍細胞）と抵抗性を有する細胞種（抵抗性腫瘍細胞）とに分類する工程、および
①上記工程②で分類された感受性腫瘍細胞ならびに抵抗性腫瘍細胞のそれぞれに

10 おいて、その遺伝子発現様式を調べて、さらに
(i) 感受性腫瘍細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、あるいは
(ii) 感受性腫瘍細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子を選択する工程

15 を含む方法。

2. ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が、以下の化学式（I）：

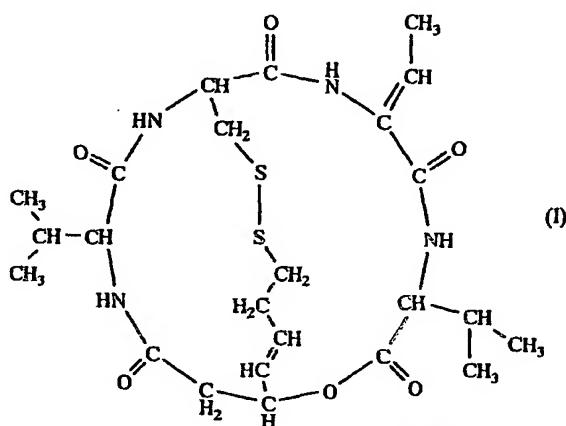


で表される化合物であるかまたはその医薬上許容し得る塩である、請求の範囲1
20 に記載の方法。

3. 腫瘍細胞が前立腺癌、胃癌、または腎臓癌由来のものである、請求の範囲 1 または 2 に記載の方法。

4. 請求の範囲 1 に記載の方法で得られた少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を、
5 少なくとも 1 種の腫瘍細胞において調べることを特徴とする、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を予測する方法。

5. ヒストンデアセチラーゼ阻害剤が、以下の化学式 (I) :



10 で表される化合物であるかまたはその医薬上許容し得る塩である、請求の範囲 4 に記載の方法。

6. 少なくとも 1 つの遺伝子が、感受性細胞で発現が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子である、請求の範囲 4 または 5 に記載の方法。

15

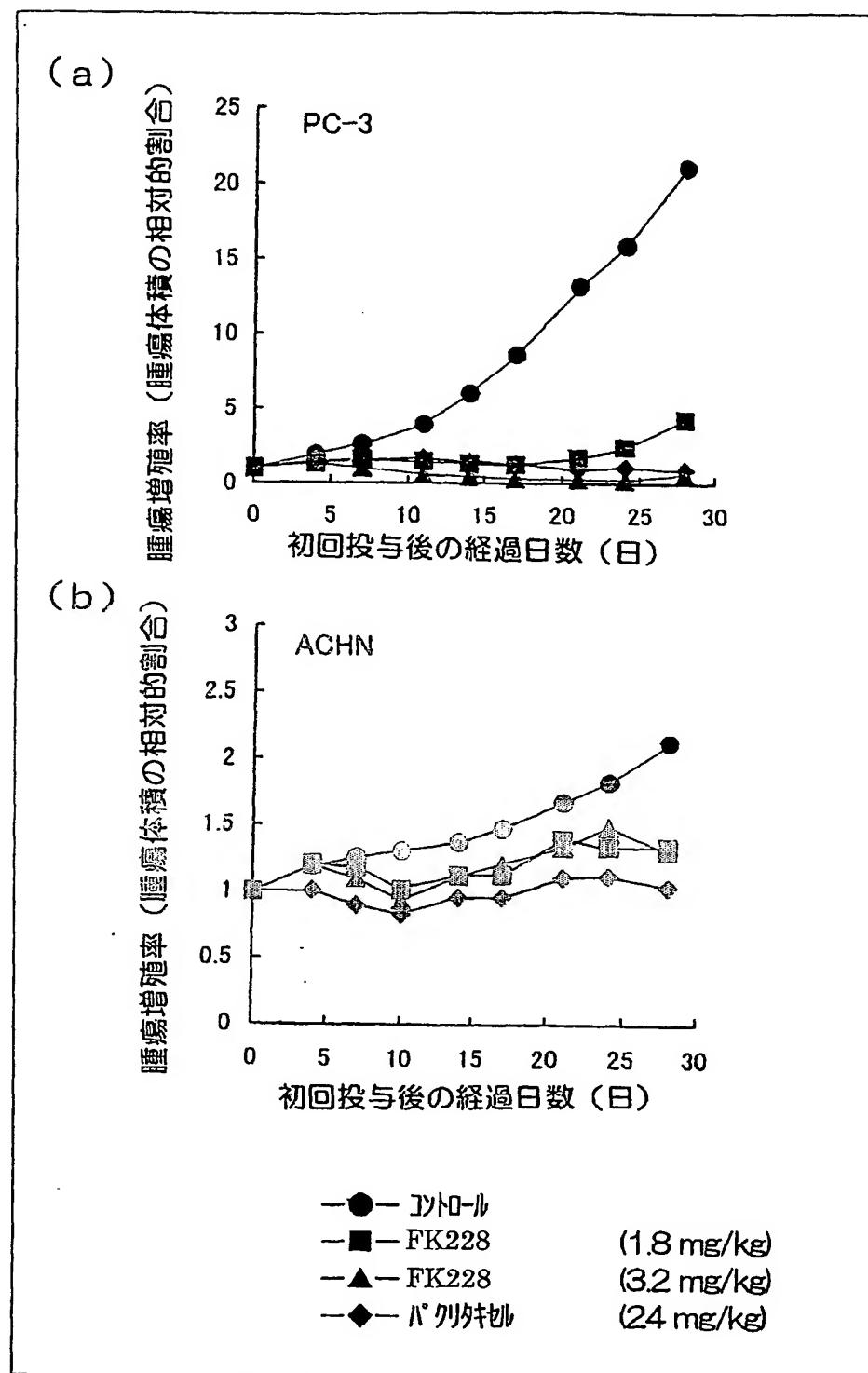
7. 少なくとも 1 つの遺伝子が、感受性細胞で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子である、請求の範囲 4 または 5 に記載の方法。

8. 請求項の範囲 1 に記載の方法で得られた少なくとも 1 つの感受性細胞で発現 20 が高く抵抗性腫瘍細胞で発現が低い遺伝子、および少なくとも 1 つの感受性細胞

で発現が低く抵抗性腫瘍細胞で発現が高い遺伝子の発現量を、少なくとも1種の腫瘍細胞において調べることを特徴とする、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果を予測する方法。

5 9. 腫瘍細胞が前立腺癌、胃癌、または腎臓癌由来のものである、請求の範囲4～8のいずれかに記載の方法。

図 1



SEQUENCE LISTING

<110> FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Prediction-method for anti-tumor effect of histone deacetylase inhibitor

<130> 09608

<150> JP 2003-041790

<151> 2003-02-19

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Chromobacterium sp.

<220>

<221> SITE

<222> (3)

<223> Xaa is an amino acid represented by the formula $\text{NH}_2\text{C}(\text{CHCH}_3)\text{COOH}$.

<221> SITE

<222> (1), (2), (4)

<223> In the formula $\text{COOHCH}_2\text{CH}(\text{CHCH}_2\text{H}_4\text{SH})\text{OH}$, the carboxylic group is bonded with the amino group of the first amino acid Val, the hydroxyl group is bonded with the carboxylic group of the fourth amino acid Val, and the SH group is bonded with the SH group of the second amino acid Cys via a disulfide bond.

<400> 1

Val Cys Xaa Val 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/001419

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/06307 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 24 January, 2002 (24.01.02), & EP 1302476 A1	1-9
Y	SASAKAWA Y. et al., Effects of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, on human lymphoma U-937 cells in vitro and in vivo., Biochemical Pharmacology, 2002, Vol.64, pages 1079 to 1090	1-9
Y	ZHENG X. et al., Gene expression of TPA induced deifferentiation in HL-60 cells by DNA microarray analysis., Nucleic Acid Research, 2002, Vol.30, No.20, pages 4489 to 4499	1-9

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 30 March, 2004 (30.03.04)	Date of mailing of the international search report 13 April, 2004 (13.04.04)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/001419

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	IIZAKI M. et al., Expression profile analysis of colon cancer cells in response to sulindac or aspirin., Biochem.Biophys.Res.Commun., 2002, Vol.292, pages 498 to 512	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/001419

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - a sequence listing
 - table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - in written format
 - in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - contained in the international application as filed
 - filed together with the international application in computer readable form
 - furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12N15/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 02/06307 A1 (藤沢薬品工業株式会社) 2002.01.24 & EP 1302476 A1	1-9
Y	SASAKAWA Y. et al., Effects of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, on human lymphoma U-937 cells in vitro and in vivo., Biochemical Pharmacology, 2002, Vol. 64, p. 1079-1090	1-9

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
30.03.2004

国際調査報告の発送日
13.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
鈴木 恵理子

4N 3037

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	ZHENG X. et al., Gene expression of TPA induced differentiation in HL-60 cells by DNA microarray analysis., Nucleic Acid Research, 2002, Vol. 30, No. 20, p. 4489-4499	1-9
Y	IIZAKA M. et al., Expression profile analysis of colon cancer cell s in response to sulindac or aspirin., Biochem. Biophys. Res. Commu n., 2002, Vol. 292, p. 498-512	1-9

第I欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第1ページの1. bの続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ 配列表

配列表に関連するテーブル

b. フォーマット 書面

コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 出願時の国際出願に含まれる

この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 据足意見：

THIS PAGE BLANK (USPTO